

**VERFAHREN ZUM AUFBEREITEN EINES BIOLOGISCHEN MATERIALS FÜR EINE
UNTERSUCHUNG MIT EINEM MIKROSKOP SOWIE ENTSPRECHENDE ANORDNUNG
MIT EINEM DERART AUFBEREITETEN BIOLOGISCHEN MATERIAL**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufbereitung eines biologischen Materials oder Präparats, insbesondere eines Gewebeschnitts auf einem Objektträger, für eine Untersuchung mit einem Mikroskop sowie eine entsprechende Anordnung eines derart aufbereiteten biologischen Materials auf einem Trägermittel, beispielsweise einem Glas-Objektträger. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein derartiges Verfahren zur Vorbereitung einer Untersuchung des (nachfolgend auch als Untersuchungsmaterial bezeichneten) biologischen Materials mit einem
10 Laser-Mikrodissektionssystem, bei welchem mittels Laserstrahlung aus dem biologischen Material einzelne Objekte ausgeschnitten und/oder herauskatapultiert und in geeigneten Aufnahmebehältern gesammelt werden können.
15

Aus der WO 97/29355 A oder WO 01/73398 A der Anmelderin ist bekannt, einzelne Objekte, welche auf einem planaren Objektträger angeordnet sind, rechnergestützt zu selektieren und mit einem Laserstrahl zu bearbeiten. Dabei kann ein selektiertes Objekt von der umgebenden Masse beispielsweise mit Hilfe des Laserstrahls rechnergestützt abgetrennt werden, um das jeweils selektierte Objekt von der umgebenden Masse freizulegen. Anschließend
25 kann das freigelegte Objekt durch einen Laser-induzierten Transportprozess mit Hilfe eines Laserimpulses, welcher auf das freigelegte Objekt gerichtet wird, von dem Objektträger zu einem Auffangbehälter katapultiert werden. Das Laser-Mikrodissektionssystem umfasst somit neben einem Mikroskop zur Untersuchung oder
30

Betrachtung des auf dem jeweiligen Objektträger befindlichen Untersuchungsmaterials auch eine Lasereinrichtung, welche einen Laserstrahl, vorzugsweise einen UV-Laserstrahl, auf das Untersuchungsmaterial richtet, um ein zuvor selektiertes Objekt von dem umgebenden Untersuchungsmaterial abzutrennen bzw. herauszukatapultieren. Als Auffangbehälter kommen beispielsweise Mikrozentrifugen- oder Eppendorfbehälter bzw. die Kappen derartiger Behälter in Frage. Ebenso können sog. Mikrotiterplatten mit einer Vielzahl von Vertiefungen oder "Wells" als Auffangbehälter eingesetzt werden.

Generell ist es bei der Aufbereitung von Untersuchungsmaterialien, welche beispielsweise für eine nachfolgende Bearbeitung mit einem Mikroskop untersucht und vorbereitet werden sollen, erforderlich, das Untersuchungsmaterial derart aufzubereiten, dass eine möglichst gute Untersuchung des Untersuchungsmaterials bei einer Betrachtung des Untersuchungsmaterials mit dem Mikroskop möglich ist.

Bei biologischen Untersuchungsmaterialien, wie z.B. Gewebeschnitten, stellt sich jedoch grundsätzlich das Problem, dass das auf den jeweiligen Objektträger aufgebrachte Untersuchungsmaterial keine vollständig ebene Oberfläche aufweist, so dass eine ausreichend gute visuelle Betrachtung über die gesamte Oberfläche des Untersuchungsmaterials nicht möglich ist. Bei einer Laser-gestützten Bearbeitung von biologischen Untersuchungsmaterialien, wie beispielsweise gemäß dem zuvor beschriebenen Laser-Mikrodissektionsverfahren der Anmelderin, wird durch die Verwendung der Mischung, Zubereitung und/oder Reinsubstanz eine bestimmungsgemäße Nutzung des Mikrodissektions-Systems erleichtert, verbessert bzw. erst möglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren zum Aufbereiten eines biologischen Materials für

-3-

eine Untersuchung mit einem Mikroskop sowie eine Anordnung mit einem derart aufbereiteten biologischen Material und einem Trägermittel, auf dem das biologische Material angeordnet ist, zur Verfügung zu stellen, wobei die optischen Untersuchungseigenschaften des biologischen Materials verbessert sind, so dass auf Grund der verbesserten Visualisierung eine bessere und genauere Betrachtung des biologischen Materials mit dem Mikroskop möglich ist. Insbesondere soll das mit Hilfe der vorliegenden Erfindung aufbereitete biologische Präparat auch zum Einsatz in einem Laser-Mikrodissektionssystem der zuvor beschriebenen Art geeignet sein, ohne dass durch die Laserstrahlung eine nachteilige Beeinträchtigung der Untersuchungseigenschaften des Materials erfolgt.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 bzw. eine Anordnung mit den Merkmalen des Anspruchs 22 gelöst. Die Unteransprüche definieren jeweils bevorzugte und vorteilhafte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird vorgeschlagen, auf das biologische Material eine in einem Lösungsmittel gelöste transparente, d.h. lichtdurchlässige Substanz in Form einer Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz aufzubringen, um Unebenheiten in der Oberfläche des jeweiligen biologischen Materials, beispielsweise eines Gewebeschnitts, auszugleichen und somit die Visualisierung des biologischen Materials und die Möglichkeit der Betrachtung mit Hilfe eines Mikroskops zu verbessern. Darüber hinaus ist die aufgebrauchte Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz derart beschaffen, dass sie sich nach Aufbringen auf die Oberfläche des Untersuchungsmaterials in Form eines Trocknens, Aushärtens oder Polymerisierens verdichtet oder aus-

härtet, so dass eine verfestigte Schicht vorzugsweise über die gesamte Oberfläche des Untersuchungsmaterials ausgebildet ist.

Wie bereits zuvor erwähnt worden ist, können mit Hilfe der auf-
gebrachten Monomer- oder Polymersubstanz Unebenheiten in der O-
berfläche des jeweiligen Untersuchungsmaterials ausgeglichen
werden, so dass eine im Wesentlichen gleichmäßig ebene Oberflä-
che des Untersuchungsmaterials erzielt wird. Die solchermaßen
veränderte diffuse Lichtstreuung erlaubt eine einfache und ge-
naue Untersuchung des Untersuchungsmaterials mit einem Mikro-
skop. Darüber hinaus wird somit eine Schutzschicht gebildet,
welche die Oberfläche des Untersuchungsmaterials vor Kontamina-
tion, Zersetzung oder Abbau untersuchungsrelevanter Komponenten,
beispielsweise durch Staub oder RNAsen, schützt und zudem das
gesamte Untersuchungsgut strukturell unterstützt, so dass beim
Schneiden einzelner Objekte mit einem Laserstrahl, beispielsweise
einem UV-Laserstrahl, keine Partikel abplatzen oder beim Kata-
pultieren mit dem Laserstrahl keine ungewollten Partikel auf dem
Objektträger entstehen oder abplatzen.

Die erfindungsgemäß vorgeschlagene Substanz in Form einer Zube-
reitung, Mischung und/oder Reinsubstanz ist vorzugsweise derart
beschaffen, dass sie sich möglichst leicht auf die Oberfläche
des Untersuchungsmaterials auftragen lässt. Demzufolge kann die
in dem Lösungsmittel gelöste und transparente Zubereitung, Mi-
schung und/oder Reinsubstanz beispielsweise in Form eines Sprays
oder Tauchbads ausgestaltet sein. Ebenso ist die Zubereitung,
Mischung und/oder Reinsubstanz vorzugsweise nicht oder zumindest
kaum toxisch, d.h. ungiftig, da bei einer nachfolgenden Bearbei-
tung des Präparats beispielsweise mit Hilfe einer Laserbestrah-
lung die Schicht in ihrem Endzustand zusammen mit dem entspre-
chenden, durch die Laserbestrahlung herausgelösten Objekt an dem
jeweiligen Objekt haften bleibt und zusammen mit diesem in einem

geeigneten Behälter aufbewahrt und von einer Bedienperson beispielsweise anschließend näher untersucht wird. Da derartige ausgeschnittene oder herauskatapultierte Proben in der Regel zur Weiterbearbeitung in einer wässrigen Lösung aufgelöst werden, sollte auch die auf das jeweilige Untersuchungsmaterial aufgebraachte Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz in wässriger Lösung gut löslich sein.

Ebenso wird vorzugsweise eine Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz verwendet, welche derart beschaffen ist, dass möglichst keinerlei Beeinflussung nachfolgender Analysen, z.B. molekularer Analysen gegeben ist. Als erfindungsgemäße Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz kommen somit vorzugsweise für das Untersuchungsmaterial hinsichtlich seiner Untersuchung nicht schädliche Mischungen, Zubereitungen oder Reinsubstanzen in Frage, wie beispielsweise Poly-, kurz- oder langkettige und/oder ganz oder teilweise ungesättigte Säuren und/oder Basen, -amide, -alkohole, -carbonate, Silikone oder Mischungen bzw. Zubereitungen davon oder ähnlicher als Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz verwendbarer Substanzen.

Ist eine Anwendung des erfindungsgemäß vorbereiteten Präparats in einem Laser-Mikrodissektionssystem beabsichtigt, ist die aufgebraachte Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz auch in Abhängigkeit von der Wellenlänge des verwendeten Lasers vorzugsweise derart beschaffen, dass das von dem Laser emittierte Laserlicht möglichst vollständig von dieser Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz absorbiert wird, um die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz zusammen mit dem davon bedeckten Untersuchungsmaterial möglichst effektiv, d.h. mit einem bestmöglichen Wirkungsgrad, schneiden bzw. herauskatapultieren zu können.

Wie bereits beschrieben worden ist, wird die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz in einem Lösungsmittel gelöst oder direkt als Reinsubstanz auf die Oberfläche des jeweiligen Untersuchungsmaterials aufgetragen. Als Lösungsmittel können beispielsweise Isopropanol oder andere, kurzkettige Alkohole, Ketone, Ester, Wasser oder Mischungen dieser oder ähnlicher als Lösungsmittel dienender Substanzen mit oder ohne Stabilisierungssubstanzen verwendet werden. Nach der Verdunstung oder dem Abzug des Lösungsmittels kann es zu einer Verdichtung oder einem Aufbau einer Polymerstruktur oder zur Polymerisation und somit zur Ausbildung der gewünschten Schutzschicht kommen, welche Unebenheiten auf der Oberfläche des Untersuchungsmaterials ausgleicht. Die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz sollte in seinem Endzustand für eine möglichst gute Betrachtung des Untersuchungsmaterials über eine Angleichung des Brechungsindex an das Untersuchungsmaterial und seiner umgebenden Materialien unter Reduzierung des ungewollten Streulichtes verfügen.

Nachdem im Bereich der Laser-Mikrodissektion häufig mit Schnittpräparaten gearbeitet wird, welche beispielsweise mit histochemischen oder immunologischen Farbstoffen gefärbt worden sind, ist die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz vorzugsweise auch derart gestaltet, dass es Wechselwirkungen des Lasers beim Schneiden von derartigen mit beispielsweise histochemischen oder immunologischen Farbstoffen gefärbten Schnittpräparaten minimiert und diesbezüglich die Untersuchungs- und Manipulationseigenschaften des Untersuchungsmaterials verbessert. Dasselbe gilt auch für fluoreszenzgefärbte Untersuchungsmaterialien, wobei bei Bestrahlung der Untersuchungsmaterialien mit Licht einer Wellenlänge die Fluoreszenz an den entsprechend eingefärbten Objekten hervorgerufen werden kann, um somit verschiedene Untersuchungseigenschaften des Untersuchungsmaterials feststellen zu können. Insbesondere kann auf diese Weise beispielsweise auch

eine Unterscheidung zwischen malignen und benignen Zellen des untersuchten Präparats möglich sein etc. Demzufolge ist es von Vorteil, wenn in die auf die Oberfläche des Untersuchungsmaterials aufzubringende Schicht Substanzen eingearbeitet sind, welche
5 beispielsweise die RNA, DNA oder/und Proteine des Untersuchungsmaterials konservieren und/oder die Fluoreszenz der Farbstoffe auf gewünschte Art und Weise beeinflussen.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend näher unter Bezugnahme auf die beigefügte Zeichnung anhand bevorzugter Ausführungsbeispiele erläutert.
10

In der einzigen Figur ist ein Objektträger 1 mit einem darauf aufgebrachtten Untersuchungsmaterial 2, beispielsweise einem Gewebeschnitt, dargestellt. Bei dem Objektträger 1 kann es sich insbesondere um einen herkömmlichen Glasobjektträger handeln.
15 Ebenso kann jedoch auch ein Glasobjektträger mit einer darauf gespannten Folie oder Membran, welche das Laserlicht des jeweils verwendeten Lasers absorbiert, verwendet werden, so dass die Membran zusammen mit dem darauf befindlichen Untersuchungsmaterial 2 ausgeschnitten und ggf. in einem Aufnahmebehälter katapultiert wird. Die Verwendung einer derartigen Membran gewährleistet, dass das durch die Laserbestrahlung ausgeschnittene
20 Untersuchungsmaterial 2 in einem Stück in den Aufnahmebehälter transferiert wird. Schließlich kann als Objektträger beispielsweise auch lediglich eine Membran oder eine Membran-Membran-Kombination verwendet werden, wobei im letztgenannten Fall die untere Membran nicht laserlichtabsorbierend ist und als Träger dient, während die unmittelbar unter dem Untersuchungsmaterial 2 und auf der anderen Membran befindliche Membran laserlichtabsorbierend ist und somit zusammen mit dem Untersuchungsmaterial 2
25 per Laserbestrahlung ausgeschnitten sowie ggf. katapultiert werden kann.
30

Wie ebenfalls aus der Figur ersichtlich ist, ist auf die Oberfläche des Untersuchungsmaterials 2 eine transparente Schicht 3 aufgetragen, welche nicht giftige und für das Untersuchungsmaterial hinsichtlich der Untersuchung nicht nachteilige Zubereitungen, Mischungen oder Reinsubstanzen enthält. Dies können Poly-, kurz- oder langkettige und/oder ganz oder teilweise ungesättigte Säuren und/oder Basen, -amide, -alkohole, -carbonate oder Silikone oder Mischungen bzw. Zubereitungen davon oder ähnliche, als Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz verwendbarer Substanzen sein. Die jeweils verwendeten Substanzen sollten sich somit vorzugsweise nicht negativ auf das Untersuchungsmaterial bzw. Gewebe 2 auswirken bzw. durch ungewollte chemische Reaktionen, wie z.B. Komplexierung, Radikalbildung, oder sonstige Reaktionen, das Gewebe oder hinsichtlich der Untersuchung in das Gewebe eingebrachte Stoffe oder Verbindungen beeinflussen oder sogar zerstören.

Die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz wird in einem Lösungsmittel gelöst oder als Reinsubstanz auf die Oberfläche des Untersuchungsmaterials 2 aufgetragen, wobei dies auf einfache Art und Weise durch Aufsprühen als Aerosol, Aufpinseln oder auch durch Eintauchen des Untersuchungsmaterials in ein Tauchbad erfolgen kann. Da die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz in einem flüssigen Zustand oder als Aerosol auf die Oberfläche des Untersuchungsmaterials 2 aufgetragen wird, kann die entsprechende Flüssigkeit oder Aerosol in die Unebenheiten, welche in der Oberfläche des Untersuchungsmaterials 2 wie in der Figur dargestellt ausgebildet sind, eintreten und diese somit ausgleichen. Durch geeignete Maßnahmen geht das Untersuchungsmaterial von seinem Anfangszustand, bei dem die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz mit einem sehr großen Abstand zwischen den einzelnen Polymersträngen oder in einem "entknäuelten" Zustand vorliegt, in seinen Endzustand über, bei dem sich die

Polymerstränge ausbilden, diversifizieren, beispielsweise "verknäulen" oder "verfasern". Die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz verdichtet sich mit abnehmendem Lösungsmittelgehalt oder durch Reaktion, so dass die auf die Oberfläche des Untersuchungsmaterials 2 aufgebrachte Schicht 3 sich insgesamt verfestigt und trocknet, d.h. es findet eine Art Aushärtung der Schicht 3 statt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nicht unbedingt ein absolut trockener und mechanisch sehr fester Zustand angenommen werden muss. Es genügt bereits, wenn eine Verdichtung bzw. Verfestigung der Schicht 3 derart stattfindet, dass ein Schneiden und Katapultieren mit einem Laser möglich ist, d.h. es genügt, wenn die Schicht 3 so trocken und verfestigt ist, dass sie z.B. nicht mehr klebrig ist.

Da es nach der Verdunstung des Lösungsmittels zur Verdichtung der Polymerstruktur und somit zur Ausbildung der gewünschten Schutzschicht 3 für das Untersuchungsmaterial 2, welches insbesondere Unebenheiten in der Oberfläche des Untersuchungsmaterials 2 ausgleicht und somit die optische Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials 2 verbessert, kommt, sollte die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz derart beschaffen sein, dass es in seiner polymerisierten bzw. verdichteten oder verfestigten und im Wesentlichen lösungsmittelfreien Struktur optimierte optische Eigenschaften hinsichtlich der genauen visuellen Untersuchung des Untersuchungsmaterials 2 mit einem Mikroskop, beispielsweise in einem Laser-Mikrodissektionssystem, ermöglicht. Dies geschieht beispielsweise durch eine laterale Homogenisierung des Lichtweges durch das Untersuchungsmaterial. Idealerweise erfolgt eine Minimierung oder Unterbindung von ungewolltem Streulicht und eine Angleichung des Brechungsindex an das das Untersuchungsmaterial umgebende Material, wie beispielsweise die Trägermembran oder den Glas-Objektträger.

-10-

Als kommerzielle Produkte, welche im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Realisierung der Schutzschicht 3 eingesetzt werden können, können beispielsweise die unter den Bezeichnungen "Formvar"TM oder "PinPoint"TM vertriebenen Zubereitungen verwendet werden. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung der unter dem Handelsnamen "Gum Rosin"TM vertriebenen Zubereitung, welche sämtliche hierin beschriebenen Eigenschaften bzw. Anforderungen an die Zubereitung erfüllt und insbesondere ein wirkungsvolles Ausgleichen von Unebenheiten in dem jeweiligen Gewebeschnitt bzw. Untersuchungsmaterial 2 und somit eine deutlich verbesserte Visualisierung ermöglicht und zudem leicht auftragbar, und in wässrigem Medium gut löslich ist. Darüber hinaus ist die letztgenannte Zubereitung auch derart beschaffen, dass es nachfolgende molekulare Analysen in keiner Weise beeinflusst und sich auf Grund seiner Absorptionseigenschaften gegenüber UV-Laserlicht in seinem Endzustand sehr gut mit einem UV-Laser schneiden bzw. katalysieren lässt.

Die Zubereitung "Gum Rosin"TM weist näherungsweise folgende Harzzusammensetzung auf:

20	Harzsäureanteil:	
	Abietinsäure	18%
	Lävopimarsäure	32%
	Neoabietinsäure	11%
	Abietar-8,13-Dien-	
25	18-Carbonsäure	
	("Palustric Acid")	12%
	Pimarsäure	9%
	Isopimarsäure	3%
	Andere	5%
30	Neutraler Anteil:	10%

Im Bereich der Laser-Mikrodissektion werden ausgeschnittene bzw. herauskatapultierte Proben in der Regel zur Weiterbearbeitung in wässriger Lösung (Puffer der unterschiedlichsten Art, je nach gewünschter Analyse) aufgelöst. Demzufolge ist es generell wünschenswert, wenn die auf die Oberfläche des Untersuchungsmaterials 2 aufgebrachte Schutzschicht 3 in wässrigem Medium gut löslich ist.

Wie bereits zuvor erläutert worden ist, können beim Schneiden bzw. Katapultieren von Proben in einem Laser-Mikrodissektionssystem Wechselwirkungen zwischen dem verwendeten Laser und der Probe derart auftreten, dass bestimmte Untersuchungseigenschaften der Probe, welche für nachfolgende molekulare Analysen etc. erforderlich sind, beeinflusst oder verändert werden. So werden beispielsweise für derartige molekulare Analysen Schnittpräparate häufig mit beispielsweise histochemischen oder immunologischen Farbstoffen gefärbt, oder es werden beispielsweise fluoreszenzgefärbte Präparate verwendet, wobei in der nachfolgenden Analyse des Präparats die Fluoreszenz des Präparats ausgewertet wird. Beim Schneiden von derartigen Präparaten mit Hilfe eines Lasers können die Wirkung der Fluoreszenz und der Farbstoffe sowie beispielsweise die RNA, DNA oder Proteine des Präparats beeinträchtigt werden.

Demzufolge ist es von Vorteil, wenn die auf der Oberfläche des Untersuchungsmaterials 2 aufgebrachte Mischung, Zubereitung oder Reinsubstanz 3 konservierende oder andersartig die Untersuchungseigenschaften des Untersuchungsmaterials verbessernde Substanzen enthält. Insbesondere bieten sich Substanzen an, welche die RNA ("Ribonukleinsäure") konservieren, und/oder Substanzen, welche die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe oder allgemein die Wirkung der Farbstoffe begünstigten, d.h. auf gewünschte Art und Weise beeinflussen.

-12-

Beispielsweise kann zur Konservierung der RNA des Untersuchungsmaterials 2 die Schutzschicht 3 insbesondere eine unter dem Namen RNAlaterTM vertriebene Substanz der Firma Ambion enthalten, wobei es sich hierbei um eine RNA-Stabilisierungssubstanz handelt. Ebenso können ähnliche RNA konservierende Substanzen, welche beispielsweise auf Amoniumsulfat in einer wässrigen Lösung basieren, verwendet werden.

Was die Substanzen zur Erhaltung bzw. Erzielung der gewünschten Fluoreszenz-Untersuchungseigenschaften des Präparats anbelangt, können sowohl Fluorophore, d.h. Farbstoffe, welche der Anregung mit definierten Anregungswellenlängen Licht anderer Wellenlänge(n) emittieren, als auch sog. "Quencher", d.h. Agentien, welche eine Fluoreszenzemission bei bestimmten Lichtwellenlängen durch Abregung auf strahlungslose Kanäle unterbinden, in die die Schutzschicht 3 ergebende Mischung, Zubereitung oder den Reinstoff eingebracht werden. „Quencher“ im eigentlichen physikochemischen Sinne sind Substanzen, die auf Grund ihrer elektronischen Struktur sehr leicht Energie aufnehmen können und diese dann strahlungslos oder auf anderen Abregungskanälen unschädlich für Gewebe oder Moleküle abgeben. Beispiele für derartige Quencher, welche in der Schutzschicht 3 verwendet werden können, sind z.B. Ketone wie Dimethylketon, Dimethylamin, Phenylmethylketon oder Acetylnaphtalin. Die zuvor genannten Quencher werden in der Schutzschicht 3 insbesondere dann eingesetzt, wenn der Energieeintrag durch den verwendeten Laser so groß ist, dass durch Energietransfer auf andere Moleküle, z.B. das Makromolekül DNA, RNA oder Proteine diese durch direkte Bindungsspaltung, Konformationsänderung oder andere Änderungen in der Primär, Sekundär, Tertiär- oder Quartärstruktur zerstört oder für nachfolgende Untersuchungen ungünstig beeinflusst werden könnten.

-13-

- Dabei werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere Quencher eingesetzt, welche durch Quenching im Sinne einer Stern-Vollmer-Analyse die Fluoreszenz bei bimolekularem Quenching wesentlich stärker unterbinden als deren Eigenabregung bei inhärent-unimolekularer Kinetik erlaubt. Dies bedingt, dass die Fluoreszenzlebensdauer bei Anwesenheit der Quenchersubstanz signifikant geringer ist als bei Abwesenheit der Quenchersubstanz. Implizit werden auch höhermolekulare Kinetiken in diese Annahmen eingeschlossen.
- 10 Obwohl die vorliegende Erfindung zuvor anhand des bevorzugten Anwendungsbereichs einer Aufbereitung eines biologischen Untersuchungsmaterials oder Präparats 2 beschrieben worden ist, ist selbstverständlich eine Anwendung des zuvor beschriebenen Verfahrens grundsätzlich auch auf andere (organische oder anorgani-
- 15 sche) Untersuchungsmaterialien, insbesondere auch auf nicht biologische Untersuchungsmaterialien, zur Optimierung der Untersuchungseigenschaften für eine nachfolgende Untersuchung mit einem Mikroskop denkbar.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Aufbereiten eines biologischen Materials für
5 eine Untersuchung mit einem Mikroskop,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass auf eine Oberfläche des biologischen Materials (2) ei-
ne transparente Schicht (3) zur Ausglei chung von Unebenhei-
ten der Oberfläche des biologischen Materials (2) zur Ver-
10 besserung von Untersuchungseigenschaften des biologischen
Materials (2) aufgebracht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass die Schicht (3) auf die Oberfläche des biologischen
15 Materials (2) aufgesprüht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass die Schicht (3) auf die Oberfläche des biologischen
Materials (2) aufgepinselt wird.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass die Schicht (3) auf die Oberfläche des biologischen
Materials (2) durch Eintauchen des biologischen Materials
(2) in ein Tauchbad aufgebracht wird.
- 25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass die Schicht (3) nicht giftig ist.

-15-

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) inert ist und beim Aufbringen auf das
biologische Material (2) das biologische Material (2) che-
5 misch und biologisch nicht nachteilig beeinflusst.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) eine transparente Zubereitung, Mi-
schung und/oder Reinsubstanz enthält.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Zubereitung, Mischung oder Reinsubstanz (2) eine
aus der Gruppe der kurz- oder langkettigen und/oder ganz
oder teilweise ungesättigten Säuren und/oder Basen, Polya-
15 mide, -alkohole, -carbonate oder Silikone oder Mischungen
davon ausgewählte Zubereitung, Mischung und/oder Reinsub-
stanz ist.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass die Schicht (3) bei Aufbringen auf die Oberfläche des
biologischen Materials (2) einen die Untersuchungseigen-
schaften des biologischen Materials (2) in Bezug auf eine
Angleichung des Brechungsindex, eine Unterdrückung unge-
wollter Lichtstreuung und/oder eine verbesserte Visualisie-
25 rung des biologischen Materials begünstigenden Charakter
hat.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) eine Laserlicht absorbierende Schicht
30 ist.

-16-

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) eine UV-Laserlicht absorbierende,
Schicht ist.
- 5 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) eine in einer wässrigen Lösung lösliche
Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz aufweist.
- 10 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) mindestens eine Substanz zur gezielten
Beeinflussung von Untersuchungseigenschaften des biologischen
Materials (2) bei Bestrahlung mit Licht enthält.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) mindestens eine die RNA des biologischen
Materials (3) bei der Lichtbestrahlung konservierende
Substanz enthält.
- 20 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) mindestens eine die Fluoreszenzunter-
suchungseigenschaften des biologischen Materials (2) ge-
zielt beeinflussende Substanz enthält.
- 25 16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) ein Fluorophor zur Erzielung einer
Fluoreszenz bei einer bestimmten Lichtwellenlänge enthält.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16,
dadurch gekennzeichnet,

-17-

dass die Schicht (3) mindestens eine Substanz, welche eine Fluoreszenz bei einer bestimmten Lichtwellenlänge unterbindet, enthält.

18. Verfahren nach Anspruch 17,

5 dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanz zur Unterbindung der Fluoreszenz derart gewählt ist, dass sie bei der bestimmten Lichtwellenlänge durch Quenching im Sinne einer Stern-Vollmer-Analyse die Fluoreszenz bei bimolekularem Quenching wesentlich stärker
10 unterbindet als deren Eigenabregung bei inhärent-unimolekularer Kinetik erlaubt.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

 dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) eine in einem Lösungsmittel gelöste
15 Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz aufweist, welche auf die Oberfläche des biologischen Materials (2) aufgetragen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19,

 dadurch gekennzeichnet,
20 dass das Lösungsmittel, in dem die Zubereitung, Mischung und/oder Reinsubstanz gelöst ist, ein aus der Gruppe der kurzkettigen Alkohole, Ketone, Ester, Benzine oder Wasser ausgewähltes Lösungsmittel ist.

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

25 dadurch gekennzeichnet,
dass die Schicht (3) derart ausgestaltet ist, dass sie nach einer Verdichtung an der Luft ein Schneiden und/oder Katalysieren der Schicht (3) sowie des darunter befindlichen biologischen Materials (2) mit einem Laserstrahl, insbesondere einem UV-Laserstrahl, ermöglicht.
30

-18-

22. Anordnung mit einem Trägermittel (1) und einem auf dem Trägermittel (1) befindlichen biologischen Material (2),
dadurch gekennzeichnet,
dass auf die Oberfläche des biologischen Materials (2) eine
5 transparente Schicht (3) zur Ausgleichung von Unebenheiten
der Oberfläche des biologischen Materials (2) zur Verbesserung von Untersuchungseigenschaften des biologischen Materials (2) für eine Untersuchung mit einem Mikroskop
aufgetragen ist.

10 23. Anordnung nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass das biologische Material (3) ein nach einem der Ansprüche 1-21 aufbereitetes biologisches Material ist.

15

1/1

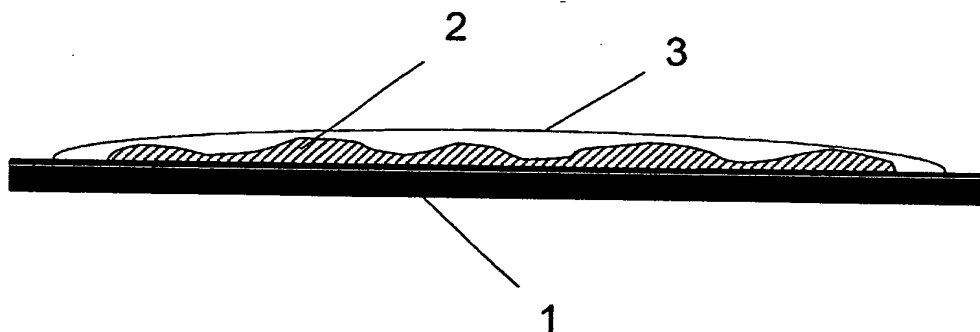


Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/08399

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 66994 A (HEAD DAVID F; KUNITAKE STEVE; REAMEY ROBERT H; RANSOM SHERRIE L; LOSSIN) 9 November 2000 (2000-11-09) abstract page 2, line 12 -page 3, line 20 page 6, line 3-20 page 13, line 11-28 page 27, line 14-24	1-9, 22, 23
Y	--- -/--	10-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 March 2003

Date of mailing of the international search report

04/04/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brison, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/08399

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMMERT-BUCK M R ET AL: "LASER CAPTURE MICRODISSECTION" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 274, no. 5289, 8 November 1996 (1996-11-08), pages 998-1001, XP000644727 ISSN: 0036-8075 figure 1	1,22,23
Y	US 2002/025511 A1 (BOVA G STEVEN) 28 February 2002 (2002-02-28) page 4, paragraph 35 - paragraph 37	10-13
A	DE 100 15 156 A (P A L M GMBH) 18 October 2001 (2001-10-18) column 3, line 45-52	1,10,11, 21
A	WO 02 14833 A (SCHUETZE KARIN ;P A L M MICROLASER TECHNOLOGIE (DE)) 21 February 2002 (2002-02-21) abstract page 10	1,10,11, 21
X	WO 97 13838 A (EMMERT BUCK MICHAEL ;LINEHAN W MARSTON (US); US HEALTH (US); BONNE) 17 April 1997 (1997-04-17) page 22, paragraphs 18-36	1,4
A	EP 0 409 550 A (ETHICON INC) 23 January 1991 (1991-01-23) page 3, line 41-43; claims 1,6	1,5,6,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP 02/08399

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0066994	A	09-11-2000	AU 4812600 A EP 1210577 A2 WO 0066994 A2 US 2002132222 A1	17-11-2000 05-06-2002 09-11-2000 19-09-2002
US 2002025511	A1	28-02-2002	US 6316234 B1	13-11-2001
DE 10015156	A	18-10-2001	DE 10015156 A1	18-10-2001
WO 0214833	A	21-02-2002	DE 10039979 A1 AU 9377701 A WO 0214833 A1	07-03-2002 25-02-2002 21-02-2002
WO 9713838	A	17-04-1997	US 5843657 A AU 716979 B2 AU 7663396 A CA 2233614 A1 EP 0862612 A1 JP 2000500325 T US 6251516 B1 WO 9713838 A1 US 6251467 B1 US 6204030 B1 US 2001031481 A1 US 6010888 A	01-12-1998 16-03-2000 30-04-1997 17-04-1997 09-09-1998 18-01-2000 26-06-2001 17-04-1997 26-06-2001 20-03-2001 18-10-2001 04-01-2000
EP 0409550	A	23-01-1991	IN 172390 A1 AU 627340 B2 AU 5907290 A CA 2021237 A1 CN 1048803 A EP 0409550 A1 JP 3068369 A BR 9003450 A ZA 9005614 A	10-07-1993 20-08-1992 24-01-1991 19-01-1991 30-01-1991 23-01-1991 25-03-1991 27-08-1991 25-03-1992

THIS PAGE BLANK (USE)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/08399

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N1/28

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 66994 A (HEAD DAVID F; KUNITAKE STEVE; REAMEY ROBERT H; RANSOM SHERRIE L; LOSSIN) 9. November 2000 (2000-11-09) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 12 - Seite 3, Zeile 20 Seite 6, Zeile 3-20 Seite 13, Zeile 11-28 Seite 27, Zeile 14-24	1-9, 22, 23
Y	---	10-13
	---	10-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. März 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/04/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Brison, O

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EMMERT-BUCK M R ET AL: "LASER CAPTURE MICRODISSECTION" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 274, Nr. 5289, 8. November 1996 (1996-11-08), Seiten 998-1001, XP000644727 ISSN: 0036-8075 Abbildung 1	1,22,23
Y	US 2002/025511 A1 (BOVA G STEVEN) 28. Februar 2002 (2002-02-28) Seite 4, Absatz 35 - Absatz 37	10-13
A	DE 100 15 156 A (P A L M GMBH) 18. Oktober 2001 (2001-10-18) Spalte 3, Zeile 45-52	1,10,11, 21
A	WO 02 14833 A (SCHUETZE KARIN ;P A L M MICROLASER TECHNOLOGIE (DE)) 21. Februar 2002 (2002-02-21) Zusammenfassung Seite 10	1,10,11, 21
X	WO 97 13838 A (EMMERT BUCK MICHAEL ;LINEHAN W MARSTON (US); US HEALTH (US); BONNE) 17. April 1997 (1997-04-17) Seite 22, Absätze 18-36	1,4
A	EP 0 409 550 A (ETHICON INC) 23. Januar 1991 (1991-01-23) Seite 3, Zeile 41-43; Ansprüche 1,6	1,5,6,11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/08399

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0066994 A	09-11-2000	AU 4812600 A EP 1210577 A2 WO 0066994 A2 US 2002132222 A1	17-11-2000 05-06-2002 09-11-2000 19-09-2002
US 2002025511 A1	28-02-2002	US 6316234 B1	13-11-2001
DE 10015156 A	18-10-2001	DE 10015156 A1	18-10-2001
WO 0214833 A	21-02-2002	DE 10039979 A1 AU 9377701 A WO 0214833 A1	07-03-2002 25-02-2002 21-02-2002
WO 9713838 A	17-04-1997	US 5843657 A AU 716979 B2 AU 7663396 A CA 2233614 A1 EP 0862612 A1 JP 2000500325 T US 6251516 B1 WO 9713838 A1 US 6251467 B1 US 6204030 B1 US 2001031481 A1 US 6010888 A	01-12-1998 16-03-2000 30-04-1997 17-04-1997 09-09-1998 18-01-2000 26-06-2001 17-04-1997 26-06-2001 20-03-2001 18-10-2001 04-01-2000
EP 0409550 A	23-01-1991	IN 172390 A1 AU 627340 B2 AU 5907290 A CA 2021237 A1 CN 1048803 A EP 0409550 A1 JP 3068369 A BR 9003450 A ZA 9005614 A	10-07-1993 20-08-1992 24-01-1991 19-01-1991 30-01-1991 23-01-1991 25-03-1991 27-08-1991 25-03-1992

THIS PAGE BLANK (USPTO)